

10694006

FOR

C. 61.923



06-22-2003



(19) REPUBLICA DE CHILE
MINISTERIO DE ECONOMIA
FOMENTO Y RECONSTRUCCION
SUBSECRETARIA DE ECONOMIA

DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

(11) N° REGISTRO

(12) TIPO DE SOLICITUD:

<input checked="" type="checkbox"/> INVENCION	<input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD
<input type="checkbox"/> PRECAUCIONAL	<input type="checkbox"/> MEJORA
<input type="checkbox"/> REVALIDA	

(43) Fecha de Publicación:

(51) Int. Cl. °:

(21) Número de Solicitud: 2181-98

(22) Fecha de Solicitud 09-09-1998

(30) Número de Prioridad: (país, n° y fecha)

(72) Nombre Inventor(es): (Incluir dirección)
DE TOANNES, Alfredo Emilio.

(71) Nombre Solicitante: (Incluir dirección y tel.)

BIOSONDA S.A.
Eduardo Castillo Velasco 2902
Ñuñoa, Santiago
CHILE

(74) Representante: (Incluir dirección y teléfono)
JARRY RICHARDSON, ALLAN, Av. 11 de Septiembre No. 1480, piso 14, Santiago, Chile, Fono: 2360848.

(54) Título de la Invención: (máximo 330 caracteres)

Hemocianina de *Concholepas concholepas*, procedimiento para su purificación, composición como inmunógeno, uso como medicamento inmunoestimulante y para diagnóstico de inmunocompetencia.

(57) Resumen: (máximo 1600 caracteres)

Hemocianina purificada para ser empleada como agente inmunógeno en vertebrados, la cual se extrae de *Concholepas concholepas* (Loco) con la siguiente composición de amino-Ácidos: Aspartato (11,7%), Glutamato (11,7%), Serina (5,4%), Glicina (6,7%), Histidina (5,9%), Arginina (4,7%), Treonina (3,9%), Alanina (7,7%), Prolina (5,8%), Tirosina (3,2%), Valina (5,4%), Metionina (1,5%), Cistina (0,2%), Isoleucina (3,1%), Leucina (7,5%), Fenilalanina (5,5%), Lisina (10,3%). Procedimiento para la purificación de dicha hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco). Uso de dicha hemocianina para preparar un medicamento inmunoestimulante y para preparar un producto útil para diagnosticar la inmunocompetencia. Composición farmacéutica que contiene dicha hemocianina junto a un vehículo apropiado para su empleo en inmunización de vertebrados.

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere en general a hemocianina purificada de moluscos, para ser utilizada como agente inmunógeno. Más en particular, el presente invento se refiere a una hemocianina purificada de moluscos diferentes de *Megathura crenulata*, comúnmente denominada KLH, por "Keyhole Limpet Hemocyanin" (Hemocianina de Volcán de Mar) un procedimiento para su purificación, su formulación como inmunógeno y su uso para la preparación de un medicamento inmunoestimulante.

ANTECEDENTES

Las hemocianinas son proteínas respiratorias presentes en la hemolinfa de muchos invertebrados. Esta proteína contiene cobre, que le confiere el característico color azul. Las hemocianinas de moluscos y artrópodos son útiles para variadas aplicaciones en inmunología, inmunoquímica y biotecnología, debido a que son potentes inmunógenos, que inducen la síntesis de gran cantidad de anticuerpos específicos. Entre estas aplicaciones se cuentan la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales contra diferentes antígenos, tales como haptenos,

péptidos sintéticos, proteínas recombinantes de microorganismos, plantas, animales y humanas. Los anticuerpos así generados pueden ser empleados en la producción de kits para el diagnóstico, la detección de moléculas orgánicas, la terapia en animales y humanos, etc.

La hemocianina de moluscos presenta una alta capacidad inmunogénica en vertebrados a causa de su alto peso molecular (peso molecular entre $4,5 \times 10^6$ a $1,4 \times 10^7$) y también por su origen filogenético, muy distante de los vertebrados. Esta molécula contiene un gran número de grupos ε-amino de lisina, los cuales permiten su conjugación con otras proteínas y con haptenos. La conjugación se realiza mediante los métodos tradicionales basados en carbodiimida o glutaraldehído. Una molécula de hemocianina acepta comúnmente hasta 100 moléculas de hapteno sin pérdida de inmunogenicidad.

W.O. Weigle ("Immunochemical Properties of Hemocyanin", Immunochemistry. vol. 1, pp. 295-302, 1964) describió las propiedades inmunoquímicas de hemocianina extraída de *Megathura crenulata*, pero demostraron también que la preparación empleada contenía al menos dos componentes antigenicos, de acuerdo a los resultados obtenidos por difusión en gel, inmunoelectroforesis y electroforesis en acetato de celulosa.

J.E. Mellema and A. Klug ("Quaternary Structure of Gastropod Haemocyanin". Nature vol. 239, pp. 146-150, 1972) demostraron la existencia de una estructura cuaternaria en hemocia-

ninas extraídas de tres diferentes gastrópodos (*Kelletia kelletia*, *Busycon canaliculatum* y *Helix pomatia*). En todas ellas, las hemocianinas forman partículas cilíndricas, no encontrándose diferencias fundamentales en su estructura. Las variaciones parecen reflejar diferencias debidas a los métodos de preparación.

H.B. Herscowitz, W.W. Harold and A.B. Stavitsky ("Immunochemical and Immunogenic Properties of Purified Keyhole Limpet Haemocyanin", *Immunology*. vol. 22, pp. 51-61, 1972) dieron a conocer un método altamente reproducible para obtener una preparación relativamente homogénea de hemocianina de *Megathura crenulata*. Este procedimiento emplea cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa, seguido de filtración en gel en perlas de agarosa. El producto obtenido se analizó mediante inmunolectroforesis en agar, electroforesis en geles de poliacrilamida y por doble difusión en agar, demostrándose que la preparación purificada contenía sólo un componente antigénico principal, en cambio el material crudo contenía múltiples componentes antigénicos.

J. Markl, A. Savel-Niemann, A. Wegener-Strake, A. Süling, A. Schneider, W. Gebauer, J.R. Harris ("The role of two distinct subunit types in the architecture of keyhole limpet hemocyanin (KLH)", *Naturwissenschaften*. vol 78, pp. 512-514, 1991) utilizando microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa, ultracentrifugación, disociación en tampones apropiados y

subsecuente cromatografía en geles nativos de poliacrilamida, demostraron que la hemocianina de *Megathura crenulata* contiene dos tipos de moléculas: una compuesta de 8 unidades funcionales denominada tipo-1 y otra compuesta por 7 unidades funcionales denominada tipo-2.

J. R. Harris, W. Gebauer and J. Markl ("Immunoelectron microscopy of hemocyanin from the Keyhole Limpet (*Megathura crenulata*): A parallel subunit model", Journal of Structural Biology. vol 111, pp. 96-104, 1993) utilizaron anticuerpos monoclonales anti-hemocianina de *Megathura crenulata* en microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa y encuentran que dentro de cada decamero existiría un arreglo en paralelo de subunidades.

R.D. Swerdlow, R.F. Ebert, P. Lee, C. Bonaventura and K.I. Miller ("Keyhole limpet hemocyanin: structural and functional characterization of two different subunits and multimers", Comparative Biochemistry and Physiology. vol 113B, pp. 537-548, 1996) demostraron mediante análisis de inmunolectroforesis que las dos formas moleculares descritas para hemocianina (KLH1 y KLH2) difieren en la respuesta inmune que provocan en animales de experimentación.

S.M. Söhngen, A. Stahlmann, J.R. Harris, S.A. Müller, A. Engel and J. Markl ("Mass determination, subunit organization and control of oligomerization states of keyhole limpet hemocyanin (KLH)" European Journal of Biochemistry. vol 248 nn

602-614, 1997) presentan un estudio de la estructura de KLH1 y KLH2 mediante microscopía electrónica de barrido analítica, electroforesis en geles de poliacrilamida, inmunoelectroforesis, digestión proteolítica controlada y secuenciación de aminoácidos. Demuestran que estas subunidades funcionales difieren en tamaño y en la forma de agregación preferente. Se encontró una masa molecular de 400 KDa y 345 KDa para KLH1 y KLH2, respectivamente. La subunidad KLH1 tiene 8 dominios funcionales diferentes de 45 a 65 Da. La subunidad KLH2 tiene 7 dominios funcionales y carece del dominio C-terminal denominado lh presente en KLH1. Las subunidades difieren en su velocidad de asociación y disociación.

C.A. Olsson, R. Chute and C. N. Rao ("Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate", Jornal of Urology. vol 111, pp 173-176, 1974) dan a conocer sus observaciones sobre la inmunoestimulación no específica con hemocianina de Keyhole-limpet en 29 pacientes (26 hombres y 3 mujeres, en un rango entre 30 y 93 años de edad, que no habían recibido radioterapia o quimioterapia) diagnosticados con carcinoma superficial transicional de vejiga. Los pacientes se dividieron en dos grupos atendiendo a la historia de la enfermedad: Grupo 1, compuesto por 10 pacientes con 13 episodios de tumor vesical que recibieron 5 mg de hemocianina subcutáneamente al momento de iniciar el estudio. Este grupo se considera su propio control, porque se conoce la frecuencia de tumores en un período de 2 años.

vio al tratamiento. Grupo 2, compuesto de 19 pacientes con diagnóstico reciente (1 año) y tratados mediante resección transuretral solamente. De este grupo 9 pacientes fueron inmunizados con hemocianina y 10 no se inmunizaron, conformando el grupo control. En ambos grupos de pacientes tratados con hemocianina se encontró una reducción significativa de la frecuencia en la recurrencia del tumor en un período de seguimiento de 2 años

C.D. Jurincic, U. Engelmann, J. Gasch and K.F. Klippel ("Immunotherapy in bladder cancer with Keyhole-limpet hemocyanin: A randomized study", Journal of Urology. vol 139, pp 723-726, 1988) presentan los resultados de dos estudios conducentes a evaluar el efecto immunoterapéutico de la hemocianina de Keyhole-limpet en pacientes diagnosticados con cáncer superficial de vejiga. El primer estudio comenzó en 1982 e involucra a 44 pacientes que fueron operados de cáncer superficial recurrente de vejiga. Previo a la terapia mediante instilación vesical con hemocianina, los pacientes fueron inmunizados con 1 mg de hemocianina intracutaneamente y al mes, recibieron 10 mg mediante instilación vesical. El grupo control recibió mensualmente 20 mg de mitomicina C. De los 21 pacientes del grupo tratado con hemocianina, 20 (95,2%) presentaron prevención parcial y completa del tumor y 3 (14,2%) presentaron recurrencia del tumor, comparado con 9 (39,1%) del grupo control. El segundo estudio comenzó en 1984 con 81 pacientes que recibieron

el mismo tratamiento que en el estudio anterior. En este caso no hay grupo control. Se encontró que 17 pacientes (20.9%) presentan recurrencia del tumor y 70 (86,4%) tuvieron parcial y completa prevención. En los pacientes tratados con hemocianina de Keyhole-limpet no se encontró efectos adversos locales o sistémicos.

J. Flamm, A. Bucher, W. Hörtl and W. Albrecht ("Recurrent superficial transitional carcinoma of the bladder: Adjuvant chemoherapy versus immunotherapy. A prospective randomized trial", Journal of Urology. vol 144, pp. 260- 263, 1990) describen los resultados de un estudio comparativo sobre la prevención y tratamiento de la terapia estándar del cáncer transicional de vejiga con etoglucidos versus la immunoterapia con hemocianina de Keyhole-Limpet, en un universo de 84 pacientes con alto riesgo de recurrencia del tumor. Previo al inicio de las instilaciones, todos los pacientes fueron sometidos a una remoción transuretral del tumor y, por lo tanto, se presumieron libres del tumor al inicio del tratamiento. El grupo de pacientes tratados con etoglucido recibió 0,565 gm semanalmente durante 6 semanas y luego mensualmente por 1 año. El grupo de pacientes tratados con hemocianina fue inmunizado con 1 mg intracutaneamente y luego recibió instilaciones vesicales de 30 mg durante 6 semanas y luego mensualmente durante 1 año. El porcentaje de recurrencia fue de un 60,9% en el grupo de pacientes tratados con etoglucido versus un 55,3% en los pacien-

tes tratados con hemocianina. La diferencias entre ambos tratamientos no fue significativa, concluyéndose que la inmunoterapia de este tipo de tumores recurrentes con hemocianina es comparable en eficacia al tratamiento estándar.

D: L: Lamm, J.I. Devane, D.R. Riggs and R.F. Ebert ("Immunotherapy of murine bladder cancer with Keyhole Limpet hemocyanin (KLH)" Journal of Urology. vol. 149, pp. 648-652, 1993) presentan los resultados de la inmunoterapia con hemocianina de Keyhole-limpet en un modelo experimental de cáncer de vejiga, en ratones C3H/HeN implantados con células MBT2 y demuestran que la hemocianina es un inmunomodulador con una significativa actividad anti-tumoral en este modelo animal.

M. M. Wishahi, I.M.H. Ismail, H. Ruebben and T. Otto ("Keyhole-limpet hemocyanin immunotherapy in the bilharzial bladder: A new treatment modality? phase II trial: Superficial bladder cancer", Journal of Urology. Vol 153, pp. 926-928, 1995) describen los resultados del tratamiento con hemocianina de Keyhole-limpet de 13 pacientes que presentan tumores transicionales de vejiga asociados con schistosomiasis urinaria. Se encontró que la inmunoterapia con hemocianina redujo la tasa de recurrencia del tumor a un 15,4% comparado con el 76,9% antes de la terapia.

Basándose en el estado de la técnica, existen preparaciones disponibles actualmente en el comercio que contienen hemocianina extraída de *Megathura crenulata* por el método anterior-

mente descrito. Las preparaciones se comercializan en la forma de hemocianina liofilizada.

Los preparados de hemocianina actualmente en uso, presentan algunos importantes inconvenientes y desventajas técnicas que no han sido superadas. En particular, debido a su tamaño y alto peso molecular, la hemocianina pierde su solubilidad en agua después de la liofilización. Si bien esto no afecta su inmunogenicidad, estorba la determinación del grado de sustitución con proteínas y haptenos, aun después de eliminar las partículas insolubles.

Por estas razones, sería deseable proporcionar un producto puro y soluble, que no presente tales inconvenientes. El presente invento debería proporcionar además un procedimiento conveniente para la preparación de una hemocianina soluble y estable y una formulación adecuada para su aplicación como inmunógeno.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra una micrografía electrónica de las partículas de hemocianina purificada de *Concholepas concholepas* (Loco). La preparación corresponde a una tinción negativa con acetato de uranilo. Se presenta la estructura de cilindro hueco de la proteína vista desde arriba (flecha corta) o de lado (flecha larga) donde además se muestran subunidades (asteris-

La Figura 2 es un gráfico que muestra los perfiles de las cromatografías de filtración en gel de la hemocianina purificada de *Concholepas concholepas* (Loco) y la hemocianina purificada de Keyhole limpet (KLH) en Sepharosa 4B-200. El eje x presenta el número de la fracción y el eje y presenta la absorbancia a 280 nm.

La curva indicada con círculos blancos corresponde a la hemocianina purificada de Keyhole limpet.

La curva indicada con triángulos blancos corresponde a la IgG.

La curva indicada con círculos negros corresponde a la hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco).

La Figura 3 es un gráfico que muestra las curvas correspondientes a los perfiles de ELISA de ratones inmunizados con un hapteno (Gizerosina) unido a hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco). El eje x presenta la dilución al doble del suero y el eje y presenta la absorbancia a 405 nm.

La curva indicada con rombos corresponde al control de Albúmina de Suero de Bovino tratado con glutaraldehído

La curva indicada con triángulos corresponde al control de Histamina unida a Albúmina de Suero de Bovino con glutaraldehído.

La curva indicada con cuadrados corresponde al hapteno (Gizerosina) ligado a Albúmina de Suero de Bovino.

La Figura 4 es un gráfico que muestra las curvas correspondientes a la titulación del suero anti-hemocianina de Con-

cholepas concholepas (Loco). El eje x presenta la dilución del suero y el eje y presenta la densidad óptica.

La curva indicada con rombos corresponde a la hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco) como antígeno.

La curva indicada con cuadrados corresponde a la hemocianina purificada de Keyhole limpet como antígeno.

La Figura 5 es un gráfico que muestra las curvas correspondientes a la titulación del suero anti-hemocianina purificada de Keyhole limpet. El eje x presenta la dilución del suero y el eje y presenta la densidad óptica.

La curva indicada con rombos corresponde a la hemocianina purificada de Keyhole limpet como antígeno.

La curva indicada con cuadrados corresponde hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco) como antígeno.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Se ha encontrado en la presente invención que la hemocianina puede ser extraída de moluscos diferentes de *Megathura crenulata*, lográndose hemocianinas que presentan una actividad inmunogénica sorprendentemente alta. Por otra parte, el preparado obtenido en esta invención, empleando fraccionamiento salino y microfiltración, no tiene las desventajas del producto liofilizado, llegándose a una solución transparente de color azul, que es estable por lo menos un año a 4°C.

De acuerdo a lo anterior, el primer aspecto de la presente invención consiste en una hemocianina purificada para ser empleada como agente inmunógeno en vertebrados. Esta hemocianina se extrae de moluscos diferentes de *Megathura crenulata* y se obtiene en la forma de una solución transparente de color azul. En la realización preferida de la presente invención, el molusco empleado es *Concholepas concholepas* (Loco).

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la purificación de hemocianina de moluscos diferentes de *Megathura crenulata*. Este procedimiento, que se realiza a 4°C, consiste en las siguientes operaciones:

- Hacer incisiones diagonales con una hoja afilada en el pie del molusco.
- Dejar escurrir la hemolinfa por 30 a 60 minutos.
- Dejar decantar la hemolinfa, para eliminar las partículas gruesas.
- Filtrar el sobrenadante por lana de vidrio
- Centrifugar a baja velocidad para eliminar células
- Someter la hemolinfa obtenida a fraccionamiento salino
- Resuspender el precipitado en una solución amortiguadora y repetir el fraccionamiento salino por una o dos veces.
- Realizar una microfiltración (0,2 μ m), para obtener la solución transparente y estéril de color azul, rica en hemocianina.

En un tercer aspecto, la presente invención consiste en el uso de la hemocianina en la preparación de un medicamento inmunoestimulante para humanos. Este medicamento es de gran utilidad para el diagnóstico y tratamiento de los pacientes que presentan inmunosupresión. Una aplicación particular de este medicamento corresponde al tratamiento de tumores y cáncer, como es el caso de los tumores epiteliales recurrentes de la vejiga.

En un cuarto aspecto, la presente invención consiste en una formulación que contiene hemocianina, útil para su empleo en inmunización de vertebrados. Preferentemente la formulación contiene 30 a 300 mg/ml de hemocianina y un vehículo apropiado para su empleo en inmunización de vertebrados. Más preferentemente, la formulación contiene 110 mg/ml de hemocianina, disuelta en 0,125 M NaCl y 5 mM de fosfato de sodio, a pH 7,2.

Como "un vehículo apropiado para su empleo en inmunización" debe entenderse a cualquier solución salina que permita ajustar la fuerza iónica y el pH de la preparación, de tal manera que pueda emplearse en la inmunización de animales.

Es importante destacar que la obtención de la hemocianina a partir de moluscos, no tiene como consecuencia la sobre-explotación del recurso, ya que una vez obtenido la hemolinfa del pie del organismo, este se puede destinar en la forma habitual, a la alimentación humana. Por lo tanto, se obtiene un producto de alto valor comercial, a partir de un subproducto de la extracción normal de estos organismos.

(0,2 μ m), para obtener la solución transparente y estéril de color azul, rica en hemocianina.

Tabla 1.- Composición de amino ácidos de la hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco).

Aminoácido	% Molar
Aspartato	11,7
Glutamato	11,7
Serina	5,4
Glicina	6,7
Histidina	5,9
Arginina	4,7
Treonina	3,9
Alanina	7,7
Prolina	5,8
Tirosina	3,2
Valina	5,4
Metionina	1,5
Cistina	0,2
Isoleucina	3,1
Leucina	7,5
Fenilalanina	5,5
Lisina	10,3

1.1. V. A. A.

La hemocianina obtenida se analizó por cromatografía líquida de alta resolución, derivatizando la muestra con cloruro de dansilo. La Tabla 1 muestra la composición de amino ácidos de la hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco)

La Figura 1 muestra una micrografía electrónica de la hemocianina purificada de *Colchonepas concholepas* (Loco).

La Figura 2 muestra una cromatografía de filtración en gel de la hemocianina purificada de *Concholepas concholepas* (Loco) en Sepharosa 4B-200. Se puede observar que el producto se pre-

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

Los ejemplos siguientes son ilustrativos de ésta invención. Se muestra la utilidad de la hemocianina como inmunógeno, el procedimiento para su extracción y su formulación.

Ejemplo 1

Purificación de hemocianina a partir de *Concholepas concholepas* (Loco)

La hemocianina se obtuvo de la hemolinfa de *Concholepas concholepas* (Loco), extraídos de la costa chilena. Todo el proceso se realiza manteniendo una temperatura de 4°C. Los locos vivos, se sangran haciendo incisiones diagonales en el pie del molusco con una hoja afilada, dejando escurrir la hemolinfa por 30 a 60 minutos. A continuación se deja decantar la hemolinfa, para eliminar las partículas gruesas y se filtra el sobrenadante por lana de vidrio. El filtrado se centrifuga a baja velocidad para eliminar células (4.000 rpm por 20 minutos). La hemolinfa obtenida se somete a precipitación con sulfato de amonio a una saturación del 50% y se deja precipitar por 12 horas, el precipitado se separa del sobrenadante por centrifugación (10.000 rpm por una hora). El precipitado se resuspende en una solución amortiguadora (PBS, pH 7.2) y se repite la precipitación por dos veces. Finalmente se realiza una diálisis para remover el sulfato de amonio y se somete a microfiltración

Día 15: 50 µg de antígeno en Adjuvante de Freund's Incompleto, en la planta de los pies.

Día 30: 50 µg de antígeno en Adjuvante de Freund's Incompleto, en la planta de los pies.

Día 60: Refuerzo, 100 µg de antígeno en PBS, intraperitoneal e intravenosa.

Antes de la inmunización, se sangró parcialmente a los animales para obtener el suero pre-inmune. La respuesta inmune se evaluó a los días 11, 25, 40 y 70 post-inmunización.

b. Evaluación de la respuesta inmune específica

Se usaron placas de multiposillo (ELISA) cubiertas con el hapteno (Gizerosina) unida a Albúmina de Suero de Bovino con glutaraldehido. Como control de especificidad se empleó Albúmina de Suero de Bovino tratada con glutaraldehido e Histamina - relacionada estructuralmente con Gizerosina- ligada a Albúmina de Suero de Bovino por el mismo método.

La Figura 3 muestra un perfil representativo del ELISA de los ratones inmunizados. El experimento muestra claramente que existe una respuesta inmune fuerte y específica contra el hapteno después de la dosis de refuerzo.

Ejemplo 3

senta un perfil cromatográfico diferente a la hemocianina purificada de Keyhole limpet.

Ejemplo 2

Inmunización de ratones con haptenos unidos a hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco)

Se acopló el hapteno Gizzerosina (GZ) -aducto de histamina y lisina- a la hemocianina extraída de *Concholepas concholepas* (Loco) empleando el método clásico descrito en "Current Protocols in Immunology" (J.E. Colligan, A.M. Kruinsbeek, B.H. Margulies, E.M. Shevach and W. Strober. Volumen 2, Capítulo 9, Peptides 9.4 Production of Anti-Peptide Antisera. National Institute of Health. Willey Interscience, 1993).

Para probar la capacidad inmunogénica de la hemocianina extraída de *Concholepas concholepas* (Loco) se realizó una serie de inmunizaciones de ratones con el antígeno indicado anteriormente (hapteno Gizerosina, acoplado a hemocianina). A continuación se describe un experimento representativo:

a. Inmunización de ratones

Se inmunizaron grupos de ratones hembra Balb/c de 2 meses de edad de acuerdo al siguiente programa:

Día 1: 50 µg de antígeno en Adjuvante de Freund's Completo, intraperitoneal y en la planta de los pies.

muestra una alta inmunogenicidad de la hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco). Además se observa una baja reacción cruzada con la hemocianina de KLH. El mismo tipo de resultado también se observa en la Figura 5, que muestra la titulación del suero anti-KLH con hemocianina de Keyhole limpet y con CCH.

Ejemplo 5

Composición de hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco)

Se preparó una composición de hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco) para su uso comercial como agente inmunogénico. Este producto presenta las siguientes características:

Presentación

Envases estériles

Contenido: 0,5 mL de solución

Concentración de hemocianina: 110 mg/ml

Vehículo: 0,125 M NaCl en 0,1 M de Fosfato de Sodio,

pH 7,0

Esta composición es estable por más de un año, cuando se guarda a una temperatura de 4°C.

Esta composición ha sido empleada exitosamente en el desa-

Generación de anticuerpos monoclonales para Gizerosina usando la hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco).

Se realizó una fusión somática entre linfocitos de bazo de un ratón inmunizado con Gizerosina acoplada a hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco) con células mieloides de la línea celular NSO/2. La fusión se efectuó siguiendo el protocolo clásico descrito por G. Köhler y C. Milstein ("Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity". Nature, vol. 156, nº 5517, p. 495-497, 1975). Como resultado se obtuvo 4 anticuerpos monoclonales que reaccionan con Albúmina de Suero de Bovino modificada con el hapteno. Dos de estos anticuerpos presentaron una alta especificidad contra Gizerosina y una baja reactividad contra Histamina en solución.

Ejemplo 4

Inmunogenicidad de la hemocianina de *Concholepas concholepas* (Loco).

Se inmunizaron ratones Balb/C con la misma cantidad de hemocianina purificada de Keyhole limpet (KLH) y hemocianina de purificada *Concholepas concholepas* (CCH), empleando las mismas condiciones descritas en el ejemplo 2. La respuesta inmune se midió por ELISA, empleando placas de poliestireno recubiertas con el respectivo antígeno. En cada caso, la unión no específica del anticuerpo a la placa se determinó usando albúmina de suero de bovino como un antígeno irrelevante. La Figura 4

como péptidos sintéticos, proteínas humanas recombinantes y haptenos.

La exposición hecha en la presente memoria descriptiva está destinada a ser interpretada en términos amplios. Los ejemplos deben ser interpretados sólo como ilustrativos y no como limitativos.

REIVINDICACIONES

1. Hemocianina purificada para ser empleada como agente inmunógeno en vertebrados, CARACTERIZADA porque se extrae de *Concholepas concholepas* (Loco) y con la siguiente composición de amino-ácidos: Aspartato (11,7%), Glutamato (11,7%), Serina (5,4%), Glicina (6,7%), Histidina (5,9%), Arginina (4,7%), Treonina (3,9%), Alanina (7,7%), Prolina (5,8%), Tirosina (3,2%), Valina (5,4%), Metionina (1,5%), Cistina (0,2%), Isoleucina (3,1%), Leucina (7,5%), Fenilalanina (5,5%), Lisina (10,3%).

2. Procedimiento para la purificación de hemocianina de *Concholepas concholepas*, CARACTERIZADO porque consiste en las operaciones de hacer incisiones diagonales con una hoja afilada en el pie del molusco, dejar escurrir la hemolinfa por 30 a 60 minutos, dejar decantar la hemolinfa, para eliminar las partículas gruesas, filtrar el sobrenadante por lana de vidrio, centrifugar a baja velocidad para eliminar células, someter la hemolinfa obtenida a ultracentrifugación, resuspender el precipitado en una solución amortiguadora y repetir la ultracentrifugación por una o dos veces y realizar una microfiltración ($0,2\mu\text{m}$), para obtener la solución transparente y estéril de color azul pálido, rica en hemocianina.

3. Uso de la hemocianina según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque sirve para preparar un medicamento inmunoestimulante.

4. Uso de la hemocianina según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque sirve para preparar un producto para diagnosticar immunocompetencia.

5. Composición farmacéutica CARACTERIZADA porque contiene hemocianina, según la reivindicación 1, y un vehículo apropiado para su empleo en inmunización de vertebrados.

6. Composición según la reivindicación 5, CARACTERIZADA porque contiene 1 a 500 mg/ml de hemocianina, y un vehículo apropiado para su empleo en inmunización de vertebrados.

7. Composición según las reivindicaciones 5 y 6, CARACTERIZADA porque contiene más preferentemente entre 20 y 200 mg/ml de hemocianina, disuelta en 0,125 M a 0,9 M de NaCl y 0,1 M de fosfato de sodio, a pH 7,0.

English Abstract - CL 2181-98

A purified hemocyanin for being used as an immunogen agent in vertebrates. Being extracted said hemocyanin from mollusks other than Magathura crenulata and obtained as a clear blue color solution. The mollusk Concholepas concholepas (LOCO) is used in the preferred embodiment of the instant invention. Furthermore, a process for purifying this hemocyanin is disclosed, consisting in the following steps: a) performing diagonal slits in the foot of the live mollusk, leaving the hemolymph to drain (bleed) for 30 to 60 minutes at 4°C, b) submitting to a saline fractioning the obtained hemolymph and c) carrying out an ultrafiltration, for obtaining the clear blue solution, rich in hemocyanin. Additionally, the present invention consists in a formulation which comprises hemocyanin, and to the of thereof in vertebrates immunization, as well as the use for preparing an immunostimulant medicine.